

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 03-080076

(43)Date of publication of application : 04.04.1991

(51)Int.Cl.

C12N 5/02  
C12N 5/08

(21)Application number : 02-190897

(71)Applicant : ORTHO PHARMACEUT CORP

(22)Date of filing : 20.07.1990

(72)Inventor : SEKINE TERUAKI

(30)Priority

Priority number : 89 383942 Priority date : 21.07.1989 Priority country : US

**(54) METHOD FOR STIMULATING PROLIFERATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE**

(57)Abstract:

PURPOSE: To selectively proliferate T4 cells, NK cells, etc., from a relatively small quantity of a starting peripheral blood lymphocyte cell population by a sequential culturing method of peripheral blood lymphocyte cells to proliferate then to a number several times more than that by a conventional method and activate them immunologically.

CONSTITUTION: At first, a relatively small quantity of peripheral blood lymphocytes are cultured with an effective amount of an anti-CD3 antibody immobilized to a culture substrate, preferably at 36.5-36.9° C, generally for 2-20 days for a first period of time; Then, the cell population so-cultured is transferred to an uncoated culturing substrate to continue culturing for a second period of time; The cell population is allowed to be cultured for a total period of time sufficient to achieve proliferation of at least one of the individual subpopulations of T4 cells, T8 cells and NK cells. The anti-CD antibody is immobilized to the culture substrate by dispersing the antibody in saline solution, adding the dispersion to a culture flask so that the antibody is allowed to sediment uniformly to the bottom of the flask.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)4月4日

C 12 N

5/02  
5/08

6807-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 末梢血液リンパ球細胞増殖刺激法

⑯ 特 願 平2-190897

⑰ 出 願 平2(1990)7月20日

優先権主張 ⑱ 1989年7月21日 ⑲ 米国(U S) ⑳ 383942

㉑ 発 明 者 関 根 暉 彬 東京都江東区塩浜1-1-13-420

㉒ 出 願 人 オーソ・フアーマシユ アメリカ合衆国ニュージャージー州08869-0602 ラリタ  
ーチカル・コーゴレー ション  
ン・ユーエスルートナンバー202

㉓ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

末梢血液リンパ球細胞増殖刺激法

## 2. 特許請求の範囲

1. 比較的少数の末梢血液リンパ球細胞から出発して、T4細胞、T8細胞及びNK細胞それぞれの少なくとも1種の細胞個体群の増殖を選択的に刺激する、断続的培養方法において、同方法が

α. 上記した比較的少数の末梢血液リンパ球細胞の第1期培養を、培養基質に固定した抗CD3抗体の効果量と共に、

β. そのように増殖した細胞を脱落してない培養基質に移して第2期培養を継続し、そして

γ. 細胞個体群を、T4細胞、T8細胞及びNK細胞それぞれの細胞個体群少なくとも1種を細胞増殖させるのに全体として十分な期間培養する、

ことからなることを特徴とする断続的培養法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 発明の分野

本発明はある種のリンパ球細胞増殖刺激剤、特にCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、ナチュラルキラー(NK)細胞を、末梢血液リンパ球細胞(PBL)集団を出発物質として選択的に増殖させる方法に関する。比較的少数の末梢血液リンパ球細胞集団から出発して、これを第1段階では培養基質に固定した抗CD3抗体と一緒に培養し、引き続いて多段階培養法で培養する。

本発明を要約すれば、本発明はある種のリンパ球細胞、特にCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、ナチュラルキラー(NK)細胞を、末梢血液リンパ球細胞(PBL)を出発物質として選択的に増殖させる方法に関し、比較的少数の末梢血液リンパ球細胞から出発して、これを第1段階では培養基質に固定した抗CD3抗体と一緒に培養し、引き続いて多段階培養法で培養する。

## 発明の背景

良く行われる免疫療法として、免疫的に活性な

細胞を患者に投与する方法がある。このような免疫的に活性な細胞としてよくナチュラルキラー細胞(NK)、リンホカイン活性化キラー細胞(LAK)、腫瘍浸潤性リンパ球細胞(TIL)が挙げられる。広範な人間症は現在効果的な治療法がなく、このような細胞免疫療法は有力な対象となり得る可能性を有している。しかしこのような免疫療法の一つの大きな欠点は、同治療に必要な多量の細胞を得るのが困難なことである。細胞の増殖及び細胞の免疫療法での活性について色々と試みがなされてきた。米国ミネソタ州ミネアポリスにあるミネソタ大学免疫生物学研究センターは、血液細胞の培養を活性化するのにOKT3+IL2の組み合わせを使用したことを報告している。この組み合わせによって活性化すると、IL2単独で使った場合と対照的に末梢血液単核の成長及びLAK活性が強化される、即ちIL2単独で活性化した培養では細胞数が7倍に増殖したのに対して、同組み合わせでは500倍に増殖したと報告されている。[Augmentation of Cell Number and LAK

in Peripheral Blood Mononuclear cells activated with Anti-CD3 and Interleukin 2 (抗-CD3及びインターロイキン-2で活性化した末梢血液単核細胞及びリンホカイン-活性化キラー細胞(LAK)の増殖), Cancer Immunology and Immunotherapy, 27: 82-88 (1988) 参照]。

国際特許出願公開(International Application Publication) WO-88/00970には、白血球を培養してLAK全体の活性が強化されることが報告されている。細胞数は30ないし100倍に増加している。同発明の2番目の特徴は、白血球をミトゲン例えば抗CD3モノクローナル抗体と共に、インターロイキン-2の存在下に培養していることである。これによって細胞数は100倍に増加している。又更に白血球にリンホカインを更に添加して培養した。抗CD3モノクローナル抗体は、白血球の細胞増殖に添加して使用し、この方法では、細胞を各量のミトゲン及びリンホカインと培養する毎に洗浄を繰り返すことが必要である。腫瘍溶解性、特にLAK活性はin vitroでのみ

-3-

測定された。

Danle, M.K. [Journal of Immunol., 135 (3): 724-730 (1985)]は一連のモノクローナル抗体を使用してLeu-2<sup>+</sup>抑制T細胞の表面における分子の発現を検討したことを報告している。Leu-2<sup>+</sup>細胞は最初に、Leu-4/T3(CD-3)抗CD3モノクローナル抗体で処置する前に単離した。著者らはLeu-2<sup>+</sup>細胞の表面で見られたこのようなLeu-4/T3(CD-3)分子複合体が、抑制T細胞の活性化及びエフェクター機能を有する他の細胞にも含まれていると考えている。

Geppert, Thomas及びPeter Lipsky [Journal of Immunol., 138, 1660-1666 (1987)]は、散布抗CD3モノクローナル抗体を使用してT4細胞の細胞種を個体群の増殖を誘導したことを報告している。同著者等は散布OKT3がT4増殖を刺激するのにあまり効果的でないことを発見している。それでOKT3はT4細胞の全体個体群の一部を活性化するに過ぎないと考えた。

ヨーロッパ特許出願(European Patent applica-

tion)第0257962号は、ナチュラルキラー細胞個体群を単離し、その一部を培養して活性化したことを報告している。

#### 図の簡単な説明

第1図は、末梢血液細胞出芽個体群の増殖を、培養フラスコに固定した抗CD3抗体の存在下、第1期をin vitroで培養し、次いで抗体を除去していない培養フラスコ中で第2期を培養し、そして最後に気体透過性の袋の中で第3期を培養した場合について示したグラフである。

#### 発明の要約

本発明は、ヘルパーT細胞、キラー/サブプレッサーT細胞、又はナチュラルキラー細胞からなる、少なくとも一つの細胞個体群を、改末梢血液リンパ球細胞の比較的少量の出芽細胞群の第1期培養を、培養基質に固定した抗CD3抗体の効果量と共にを行い、そのように培養した細胞を抗体を除去しない培養基質に移して第2期培養を継続し、そして改末梢血液リンパ球中の各種T細胞の各個体群及び/又はNK細胞を活性化、及び/又は分

化及び増 させるのに全体として十分な期間培養することからなる。末梢血液リンパ球細胞の細胞を刺激し、該細胞を活性化及び／又は分化させる多段階法を指向したものである。

更に好ましい実施態様では、細胞数が大きく増殖した同個体群を第3増殖培養段階で、致子免疫療法で使用する前にミトゲンの存在下に培養基質と接触させる。特に好ましい実施態様では、それぞれ別れている培養基質との接触を多段階で、出発細胞個体群が、全細胞数で100倍以上に増殖するのに十分な期間実施する。

下記の用語の定義は "Immunology" (Reitt, I. 他著 Gower Medical Publishing社 (London, New York) 発行) 及び "Immunology: A Synthesis" (E. Gellib, Sinauer 著, Inc., Inc. 社 (Massachusetts) 1987年発行) から取ったものである。

ここで使用されている "ヘルパーT細胞" は、少なくともT3及びT4分化抗原を有する細胞であり、リンパ球細胞の一部と考えられている。

ここで使用されている "キラー/サブプレッサー

細胞" は、少なくともT3及びT8分化抗原を有する細胞であり、機能的にリンパ球細胞の一部と考えられている。

ここで使用されている "ナチュラルキラー細胞" はウイルス感染した細胞表面での変化を認識できるリンパ球細胞を意味する。これらの細胞はしばしばインターフェロンによって活性化されるか、あるいはウイルス感染した細胞それ自体によって製造される。現在この細胞個体群は主にリンパ球細胞個体群の中で発見され、骨髓由来と信じられている。

ここで使用されている "抗CD3抗体" は通常実質的にモノクローナルであり、上記したCD3抗体の全て又は一部を認識する。

本発明は多くの利点を有する。例えば、本方法は末梢血液リンパ球細胞の出発個体群からCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>及びナチュラルキラー細胞個体群を選択的に増殖させることが発見された。更にこの増殖が単独とは完全に独立である。本発明の方法で得られる細胞増殖後の増加は、本技術分野で公知の方

-7-

法と比較して、期待以上に優れており、ある場合では従来技術で公知の方法の30倍にも達した。このような活性化細胞の、ある種のターゲット腫瘍細胞株、例えばK562に対する細胞毒性(cytotoxicity)も又向上した。又細胞を多段階で繰り返し培養する必要性も本発明の方法を使用することにより無くなった。

思いがけないことに、本発明の方法による多段階 *in vitro* 細胞培養により、通常細胞増殖後の何倍もの増殖が誘導される。これは4乗あるいはそれ以上のオーダーで、リンパ球細胞の数を増加させ、免疫的に活性化されるので、実行可能な技術として致子免疫療法に適用するのに適している。  
発明の詳細な説明

本発明により、比較的少数の末梢血液リンパ球細胞から出発して、少なくとも1種の "活性化リンパ球細胞" の明確な細胞数の増殖させる多段階 *in vitro* 法を提供される。ここで使用されている "活性化リンパ球細胞" は、腫瘍細胞株を殺すことができるナチュラルキラー活性を示す細胞(NK

-8-

細胞)、腫瘍殺菌能力を示す細胞(TIL細胞)、そして新しい腫瘍およびNK-抵抗性細胞株を溶解する能力を示す細胞(LAK細胞)を示す。  
"活性化リンパ球細胞" は又、ヘルパー/インジュクサーT細胞、およびサイトトキシック/サブプレッサーT細胞能力を強化したリンパ球細胞をも示し、そして同細胞は免疫学的能力のある細胞の抗原性の分化を示す。*in vitro* 法はヘルパー/インジュクサーT細胞、サイトトキシック/サブプレッサーT細胞、及びナチュラルキラー細胞の表現型を有する細胞の増殖を特に選択的に行う。

強化細胞の単独個体群、例えばヘルパーT細胞、又は個体群の組み合わせを含む組成物は、患者(動物又は人間)に致子免疫療法の目的に必要な量の細胞個体数だけ投与される。このような患者は例えば、免疫疾患を有する患者、特に癌患者、自己免疫疾患を示す患者等である。

本発明の方法による選択的細胞増殖の *in vitro* 刺激は、比較的少量の山形末梢血液リンパ球細胞を、それに抗CD3抗体を固定した培養基質と接

触させ、次いで該細胞個体群を第2の抗体を散布していない培養基質と接触させて行う。好ましい実施段階では、第3段階の接触を行う。接触する用語は一般に細胞培養を意味し、断片では受け入れられている。

第1接触段階の培養基質を調整するには、抗CD3抗体を、該抗体が末梢血液リンパ球細胞上に存在する表面分子と接触できるような方法で散布できる限りは、同目的に適した従来の基質、例えばガラス、ナイロン、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリオレフィン等に固定する。抗体が散布されていない(uncoated)ポリスチレン培養基質、即ち培養のために処理をしていない基質が好ましく使用される。同基質はそのとり得る全ての配製構成で広範囲に使用することができるが、細胞培養技術を容易にする形、例えばビーカー、びん、細胞培養フラスコ、気体透過性細胞培養袋等であるのが好ましい。現時点では、末梢血液培養フラスコ、例えば従来から懸濁培養で使用されてきたフラスコ類が好ましい。

-11-

箇月は安定である。

本発明の方法で抗体を散布した培養基質を使用する前に、抗CD3抗体を散布した基質は好ましくは洗浄してデブリあるいは過剰な抗体を除去することができる。適当な洗浄媒体、例えば無菌食塩水を使用することができる。

本発明の方法の第1段階の準備で、比較的少量の血液(約10 ml)を処理して末梢血液リンパ球細胞を分離する。分離に適当な処置はフィコールブランク(Ficoll-plaque)密度遠心法等の分離技術である。適当な末梢血液リンパ球細胞数は約  $5 \times 10^5$  ないし約  $3 \times 10^7$  である。

こうして分離された細胞個体群は、生細胞と適合している適当な媒体で洗浄することができる。分離したリンパ球細胞個体群は、その前に抗CD3抗体を散布した培養基質(フラスコ)に、適当な組織成長媒体、例えば最小必須媒体、RPMI 1640、及び完全な媒体を添加し、その中に分散させる。このように細胞の細胞密度は、抗CD3抗体散布表面  $1 \text{ cm}^2$  当たり約  $6 \times 10^3$  ないし  $4 \times 10^5$

使用する抗CD3抗体の適当な濃度は、固定培養  $1 \text{ cm}^2$  あたり、約50 ngないし約5,000 ngである。抗体は一般に細胞成長媒体と相溶性の媒体に分散させる。例えば抗体は食塩水、無菌塩酸食塩水、メチルセルローズ及びその他に分散させることができる。得られる分散液のpHもまた生理学的に許容できるものでなければならず、好ましくは約pH6.5ないし7.8、より好ましくは約6.7ないし約6.9である。培養温度は好ましくは約35℃ないし約38℃、より好ましくは36.5℃ないし約36.9℃である。

抗CD3抗体の分散液を固定培養基質(好ましくは培養フラスコ)に添加し、容器の底に底るべく均一に沈着させて固定する。同技術分野の熟達者にとって、このような固定化が、培養基質の表面が平滑になったと認められた時に起こり、最も適当なのは、その結果凍水性になることは理解されよう。固定化には通常約1ないし4時間あれば十分である。固定化された抗体は、使用するまで4℃で保管でき、同保存条件下で少なくとも約6

-12-

細胞である。時々新鮮な媒体を培養細胞に添加できる。散布化抗CD3抗体を使用した第1段階培養の期間は一般に約2日ないし20日間である。

本発明の方法の第2段階で、好ましくは約5ないし8日後、第1段階からの細胞は無処理(抗体を散布していない)培養基質、例えば散布していない培養フラスコに移し、培養媒体、例えば完全媒体又は従来同等物中で、細胞密度を略同じにして培養を継続する。同培養第2段階は、2日間ないし30日間、好ましくは約1日ないし10日間続ける。本発明者は細胞に押られることは望まないが、現時点では、本発明の多段階培養が、ある種の細胞個体群の分化及び増殖に対してを期待以上に展れているのだと考えている。これらは高価な固定化抗CD3抗体が、IL-2の存在下でも、T細胞の成長を実際に抑制できる技術からも確かである。このようにして、過剰では固定化抗体を含む同じフラスコ中で長時間細胞培養を行うと、PB1の増殖を強化するよりも抑制するほうに働くことが実際に起こり得た。

-13-

-446-

-14-

増 させた細胞個体群を養子免疫及び癌治癒入 (点滴) に使用するのに先立って、逐次培養によって得られた増殖細胞個体群を含む細胞培養物を更にもう一つの段階でリンホカイン、例えば T N F、インターフェロン ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、又は  $\gamma$ )、及び I L-2 と接触させることができる。リンホカインは直接添加するか、又は細胞それ自体によって分泌されるのを、適量量の従来のミトゲン、例えばファイテムアグルタン、コンカナバリン A 等を添加して刺激することができる。

この第 3 段階は培養段階の延長と増強することができる。細胞個体群の活性化を強化し、十分な量の細胞を治療的に無害に製造する。好ましいリンホカインは濃度が約 200 U/ $\mu$ g ないし 2,000 U/ $\mu$ g の I L-2 である。適当な細胞密度は、増殖培養中は比較的高く、 $1.4 \times 10^4$  cells/ $\mu$ g であることができる。同細胞を、患者に注入するための回収する前に、このリンホカインと約 2 ないし 6 日間接触させる。この第 3 段階段階のために好ましい細胞培養基質は、従来の使用されている気体透過

性細胞培養用袋であり、必要によってこの第 3 培養段階中、細胞密度を比較的高く維持する。細胞培養袋は、その底の部分から養料を供給できるので、第 3 段階で使用するのが便利であり、又適している。袋は又、経済的であり、細胞状態を保つのが容易であり、使い捨て可能であり、狭い空間、例えば培養装置中での操作が容易である。しかし、上記した細胞密度を保つことができ、種々の気体 ( $O_2$ 、 $CO_2$ 、その他) での処理が可能であればどのような培養容器を使用しても支障は無いはずである。

ここで再び、本発明者は懸念で拘束されることは欲しないが、この第 3 段階は開始以上に活性化細胞個体群を優れた収率で与えていると希致することができる。各種のリンホカインが、T 細胞から抗 CD3 抗体の阻害によって分泌されるが、先行技術の方法では、どうしても必要な洗浄段階で完全洗い流されてしまうようである。本発明の多段階法は、培養途中であらゆる必要がなく、そのために分泌されたリンホカインが洗い流され

-15-

-16-

てしまうことがないという利点を有する。本発明では単に希地に添加するだけで、リンホカイン濃度を乱すことはない。細胞培養で分泌リンホカインをこのように維持することが細胞個体群成長を強化させるもう一つの対策のようである。

増殖した細胞は免疫に基づいた疾患の広範な治療に使用することができる。T4 細胞、T8 細胞、又は NK 細胞の強化細胞群を使用するのが適している場合、それらを単独か又は組み合わせで使用するいずれの場合も、少量の培養材料から、そのような細胞型の選択的に強化された細胞個体群を与える。これらの細胞個体群は細胞毒性、そして場合により免疫抑制作用を有していることが知られている。ナチュラルキラー細胞は、非特異的に腫瘍細胞及びウイルス感染細胞を殺す能力を有し、そして又免疫反応を調節する役割を演ずることが知られている。このリンパ球細胞の個体群は種々の療法に使用するのが適していることが知られている。要求されてはいないが、このような強化細胞個体群は、治療を受ける患者の自己発

生物が好ましい。

本技術分野の熟達者は、従来の分離技術が、特定の細胞個体群、例えば T8 細胞を、本発明の方法によって大きく増殖された F B L 細胞 (もしこのような細胞の純粋な個体群が必要ならば) から分離するのに利用できることは理解されよう。処理を必要とする患者は自己発生性の、又はまたは移植体内注入治療、ウイルス投与が可能である細胞個体群を投与するか、又はその他の適当と考えられる投与法で処置される。本発明の方法によって処置される細胞は適合性細胞、例えば脾臓培養液、平衡液、ノタルセルコース、培養液を含むヒトアルブミン等中に懸濁させることができる。

この強化された細胞個体群使用の代表的な一例は病状の進んだ転移癌患者を治療する能力である (詳細は下記実施例の項参照)。癌の場所は広範囲に、例えば皮膚、リンパ節、腹部、肝臓、肺臓、等と変わり得る。この種の病気では、活性化リンパ球細胞は注入又は点滴するには  $10^4$  細胞/ $\mu$ g 以上の濃度で、1 週間に数回投与する必要がある

[例えばRosenberg et al., New England Journal of Medicine, 319, (25) 1678 - 1680 (1988) で、典型的な疫学法を参照されたい]。

このような養子免疫治療法は、同時に腫瘍を有するホストの免疫抑制処置と同時に組み合わせで実施される。このような免疫抑制処置は骨髄移植を併行して実施するか、又は薬剤、例えばシクロホスファイド、ペブロマイシン、シスプラチン(CDDP)、フルオロウラシル(5-FU)、ヴィンクリスタイン(VDS)、デカルバジン(DIC)を同時に投与して行われる。患者には同時にリンホカイン、例えばIL-2、IL-3、及びTNP因子を投与することもできる。

治療用途については幾分詳しく述べてきたが、本発明の培養方法が、そのようにして増殖した細胞を腫瘍の治療的投与以外の用途にも使用できることは既に明白である。例えば本発明の方法によって増殖した健康な人のリンパ球細胞を、リンホカイン製造の原料として、並びにリンパ球細胞中に含まれる物質の増殖及び／又は調整手段として非

常に有用であり、効果的である。

以下に本発明の特定実施形態を挙げるが、これらは単なる例示であり、本発明はそれらに何等制限されないと考えられる。

#### 実施例

末梢血液リンパ球細胞のin vitro刺激を抗体OKT3を識別する固定化モノクローナルCD3に露出させて実施した。

全血10 ml から得た末梢血液リンパ球細胞(PBL)(約 $1.4 \times 10^6$  PBL)をOKT3を塗布したフラスコ中で8日間培養した。細胞数は元の培養細胞数の330倍に増加した。その結果を下記表1に示す。

-19-

症例名	培養日(日)	増殖数 ( $\times$ 原細胞数)	表現型					
			CD4	CD24	CD3	LEU1	LEU15	IL-2R
46	19	670	98	51	37	0.6	28	90
48	13	330	95	64	28	0.5	30	95
48 (対照)	13	13	47	34	7	12	15	11

※ 一定の表現型を示す細胞の%として測定

-21-

対照として、何も処理していない、抗体を塗布していないフラスコ中で、同数のPBLを8日間培養した際の細胞数の増加は元の数の僅か13倍であった。OKT3-塗布フラスコ中で培養したPBLの表現型は、何も処理していない未塗布対照フラスコ中で培養したPBLとは異なっていた。OKT3-塗布フラスコ中で培養したPBLの主要表現型は、表1図に示したように、CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>T細胞であった。これらの表現型は養子免疫療法で効果的な細胞集団であることが示された。

2番目の実験ではPBLをOKT3-塗布フラスコ中で8日間培養し、次いで何も処理していない、未塗布フラスコ中で培養を更に21日間続けた。細胞数は $1.7 \times 10^6$ 個(出発PBL細胞数の30,000)に増加した。T細胞数がこのように大きく増殖し、特にこれらの細胞がT細胞であったため養子免疫療法に十分であると決定された。同様に腫瘍は患者の、養子免疫療法に使用された。

結論として、養子免疫療法で使用するための十

分な数の活性化T細胞が、僅か10 mlの全血から出発して、本発明の多段階培養法を使用して得られた。

#### 材料及び方法

以下にこれら 一定の実施例で使用する方法についてより詳細に説明する。

#### OKT3散布培養フラスコの調製

OKT3を無菌状態の食塩水溶液(PBS)で希釈した、1ないし30  $\mu$ g/ml濃度で、pH7.4の培養液を培養フラスコに、表面積25 cm<sup>2</sup>のフラスコには3 ml、表面積75 cm<sup>2</sup>のフラスコには約 6 ml、そして225 cm<sup>2</sup>のフラスコには約10 ml注いだ。この培養液をフラスコの底に広げ、室温で2時間静置した。培養液散布フラスコは、使用するまで冷蔵庫中に保管した。使用の際に、散布フラスコをPBSで3回洗浄した。

#### 培養

Ficoll-paque 密度遠心法で血漿からPBLを分離し、RPMI-1640培養地で3回洗浄、そして完全培養液中に細胞密度約  $1 \times 10^6$ 細胞/mlで懸濁さ

せた。細胞懸濁液約10 mlないし20 mlをOKT3-散布培養フラスコ(75 ml)中で培養した。OKT3-散布フラスコ中で培養している間に培養液は黄色に変わった。その時点で約10 mlの新しい完全培養液を添加した。約3ないし8日後、細胞を、何の処理もしていないフラスコに移し、細胞密度が1ないし  $2 \times 10^6$ 細胞/mlになるまで培養を続けた。都合により、養子免疫療法注入の3日前に培養物を250 U/mlのIL-2を含むAIM-V培養地で希釈し、細胞密度を約3ないし  $5 \times 10^6$ 細胞/mlとし、培養瓶(Dupont製 Sterile)につき1,000 mlづつに分けた。更に3日間培養してから、細胞を集めた。結果は第1図を見られたい。

#### 完全培養地

10% ヒト血清

1 mM ビルビン酸ナトリウム

1 mM オキザル酢酸

0.2 U/ml インスリン

60  $\mu$ g/ml カナマイシン

(50ないし100 nM 2-メルカプトエタノールを

-23-

-24-

#### 同時添加)

2 mM レグルタミン

IL-2 1,000 U/ml RPMI-1640

#### 培養培養用培養地

AIM-V (CIBCO)

1 mM オキザル酢酸、

1 % 血清

250-U/ml IL-2

(50ないし100 nM 2-メルカプトエタノールを同時に添加)

#### OKT3散布で使用する培養フラスコ

未処理培養フラスコ、例えば懸濁培養用フラスコが、従来の細胞培養用に処理した通常の付着細胞培養フラスコよりも良いようである。

#### 活性化PBL固体系を使用した養子免疫療法

末期症患者を、かれらの全血から、本発明の多段階法によって活性化し、細胞数を増加させて得た一定量の自己由来PBLで治療した。注入一回当たり、使用する細胞量は、約  $4 \times 10^{10}$ ないし約  $16 \times 10^{10}$ の範囲で、この程度の増殖量は、

本発明の方法で培養して約20日間達成される。活性化PBLは主にT4<sup>+</sup>またはT8<sup>+</sup>細胞固体系から成っている。この活性化細胞で治療した患者では全て、腫瘍の位置に拘わらず、大きさが50%以上明らかに小さくなった。下記の表はこの実験のデータ及び結果をより特異的に示したものである。

-25-

-449-

-26-



症例NO.	年齢	性別	移植状態	移植位置	P.S.*	合計生存日数
1	44	男性	悪性リンパノーマ 肝臓	皮膚	1	9回
2	57	男性	悪性リンパノーマ	リンパ節	0	9回
3	46	女性	悪性リンパノーマ	皮膚	0	3回
						4.2x10 <sup>10</sup>

\* P.S.: performance status (実態状態)

症例NO.	並用薬剤	反応	移植位置	経過時間 (月)	経過時間 (月)
1	deplecyin IL-2	PR NC	皮膚 肝臓	3	経過は約5ヶ月生存
2	CDOP VDS BTIC IL-2	PR	リンパ節	0	経過は約5ヶ月生存
3	...	PR**	皮膚	0	経過は約5ヶ月生存

\*\* 腫瘍の大きさが50%以上小さくなればPRとする

-27-

-28-

本発明の主な特徴及び効果を示せば以下のようである。

1. 比較的少数の末梢血液リンパ球細胞から出発して、T4細胞、T8細胞及びNK細胞それぞれの少なくとも1種の細胞増殖を選択的に刺激する、選択的培養方法において、同方法が

a. 上記した比較的少数の末梢血液リンパ球細胞の第1増殖を、培養基質に固定した抗CD3抗体の効果量と共に、

b. そのように培養した細胞を抗体を除去していない培養基質に移して第2増殖を継続し、そして

該細胞を、T4細胞、T8細胞及びNK細胞それぞれの少なくとも1種を細胞増殖させるのに全体として十分な期間培養する、

ことからなることを特徴とする選択的培養法。

2. 上記第1項において該選択的培養法を、末梢血液リンパ球細胞の出発細胞数と比して全体で少なくとも約100種の細胞段に増殖させるのに十分な期間実施することを特徴とする培養法。

3. 上記第2項において、該細胞増殖が少なくとも約10,000ないし30,000であることを特徴とする培養法。

4. 上記第2項において、該末梢血液リンパ球細胞数が約10<sup>4</sup>ないし10<sup>6</sup>であることを特徴とする培養法。

5. 上記第4項において、該抗CD3抗体が培養フラスコの表面に固定されていることを特徴とする培養法。

6. 上記第5項において、該表面に固定された抗CD3抗体の密度が表面1cm<sup>2</sup>当たり約50ngないし約5,000ngであることを特徴とする培養法。

7. 上記第6項において、該抗CD3抗体がOKT3であることを特徴とする培養法。

8. 上記第4項において、該第1培養段階が約3日ないし8日間であり、第2培養段階が約3日ないし21日間であることを特徴とする培養法。

9. 上記第8項において、第2培養段階が約3日ないし約5日間であることを特徴とする培養法。

10. 上記第8項において、更に

c. 該細胞をリンホカインを含む第3培養基に移し、更に約2日ないし約5日間培養することを特徴とする培養法。

11. 上記第10項において、該リンホカインが實質的にIL-2、TNF、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン及び $\gamma$ -インターフェロンからなる群れから選ばれることを特徴とする培養法。

12. 上記第11項において、該リンホカインがIL-2であることを特徴とする培養法。

13. 上記第12項において、該細胞を該リンホカインと共に約2日間ないし約4日間培養することを特徴とする培養法。

14. 上記第13項において、該培養温度を約36.5℃ないし36.9℃を維持し、そして該pHを約6.7ないし6.9に維持することを特徴とする培養法。

15. 上記第14項において、該第3培養基が気体透過性培養液であることを特徴とする培養法。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、末梢血単核細胞長個体群の増殖を、培養フラスコに固定した抗CD3抗体の存在下、

第1期をin vitroで培養し、次いで抗体を塗布していない培養フラスコ中で第2期を培養し、そして最後に気体透過性の袋の中で第3期を培養した場合について示したグラフである。

特許出願人 オーソ・ファーマシューチカル・コーポレーション

代理人 弁理士 小田島 平 吉

